



Producción de Plantas Genéticamente Puras de Uchuva

Physalis peruviana

**Ligia Suescún Peñaranda
Erika Sánchez Betancourt
Magda Gómez Marroquín
Francy Liliana García Arias
Víctor Manuel Núñez Zarantes**

634.4
P96
Ej. 2



634.4
P96
9.2
Salitre
34139

Producción de Plantas Genéticamente Puras de Uchuva

Physalis peruviana



**Erika Sánchez Betancourt
Francy Liliana García Arias
Ligia Suescún Peñaranda
Magda Gómez Marroquín
Víctor Manuel Núñez Zarantes**





*República de Colombia
Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*

Autores

Erika Sánchez Betancourt
Francy Liliana García Arias
Ligia Suescún Peñaranda
Magda Gómez Marroquín
Victor Manuel Núñez Zarantes

Entidades participantes:

Consuelo Caldas Cano

Presidenta Ejecutiva
Cámara de Comercio de Bogotá

Juan Camilo Restrepo Salazar

Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural

Juan Lucas Restrepo Ibiza

Director Ejecutivo
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA

Fernando Matallana

Gerente
NOVACAMPO International Trading Society

Pedro León Gómez

Director
C.I. Muisca

© Cámara de Comercio de Bogotá

ISBN: 978-958-688-379-5

Diseño, diagramación e impresión:
Editorial Kimpres Ltda.
PBX: 413 6884
www.kimpres.com.co
Bogotá, D.C. Agosto 2011

Introducción

El género *Physalis* incluye alrededor de cien especies que se caracterizan porque sus frutos están cubiertos por el cáliz. *Physalis peruviana* L., nombre científico de la uchuva, es la especie más conocida del género, originaria de los Andes, especialmente de Perú, Bolivia y Colombia donde crece como planta silvestre y semisilvestre en zonas entre 1.500 a 3.000 m.s.n.m. Se encuentra desde Venezuela hasta Chile, a todo lo largo y ancho de la cordillera andina, pero sólo en Colombia se cultiva con fines comerciales, donde posiblemente se inició el cultivo en la década de los años 80 y ha llevado al país a ser el primer productor mundial. El cultivo en Colombia se ubica principalmente en Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Nariño, Valle y Tolima. A la fruta se le atribuyen propiedades medicinales y nutricionales especiales, entre las que se mencionan muchas propiedades medicinales tales como antiasmático, diurético, antiséptico, sedante, analgésico, fortificante del nervio óptico, alivio de problemas de garganta, eliminación de parásitos intestinales y amebas. En el mundo, el cultivo se encuentra en toda América, en Europa, Asia y África. La uchuva colombiana, tiene un sabor agridulce, aroma y color peculiar muy agradable y con grandes beneficios para la salud humana. Por esta razón, está siendo exportada a países desarrollados como Francia, Dinamarca, Finlandia, Alemania, Holanda, Inglaterra y Japón. Aunque Colombia posee las condiciones propicias para el cultivo de la uchuva, una gran limitante es la falta de material de siembra con características morfológicas, químicas y agronómicas, para la selección y mejoramiento genético, con atributos de rendimiento, calidad de fruto, resistencia a enfermedades, y composición química conocidas deseable. El productor necesita de plantaciones genéticamente mejoradas con mejor adaptación a las condiciones de cultivo en las zonas productoras del país que permitan mejorar la calidad del producto y bajar costos de producción. Para lograrlo, es necesario la creación de programas de producción de variedades en un corto y mediano plazo, utilizando material que se siembra

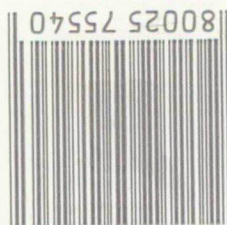


actualmente para exportación y otros que se obtengan por investigación. El mejoramiento genético convencional ofrece posibilidades para la obtención de variedades e híbridos pero es un proceso largo y lento, que ante las grandes necesidades de sostenibilidad del cultivo resulta a largo plazo y costoso. Como alternativa, la biotecnología ofrece la tecnología de producir plantas completas in Vitro a partir de granos de polen mediante el cultivo de anteras, las cuales darán origen a líneas mejoradas o líneas puras para la obtención de híbridos comerciales. En esta publicación se describe por primera vez la metodología desarrollada para la implementación de un proceso de producción masiva, rápida y rutinaria en la obtención de nuevas variedades e híbridos comerciales de uchuva.

Contenido

Generalidades	7
Descripción de la especie	7
Atributos, cualidades y usos principales	8
La uchuva en el mundo	8
La uchuva en Colombia: el cultivo	9
Biología de la planta	10
Morfología de la flor de uchuva	11
La antera	11
Desarrollo del grano de polen	12
Reproducción, Genética y Genotipos existentes	13
Requerimiento de material de siembra mejorado	14
El mejoramiento tradicional	15
La biotecnología	15
El cultivo de anteras	16
Aplicaciones del cultivo de anteras en mejoramiento genético de plantas	16
PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CULTIVO DE ANTERAS EN UCHUVA	16
Selección de las plantas donadoras de botones florales	17
Determinación del estado de desarrollo del polen	17
Desarrollo floral y la relación con el estado de desarrollo de las microspóras	18
Colecta y pretratamiento de los botones florales de las plantas	20
Desinfección superficial de los botones florales y siembre de las anteras en medio de cultivo	21
Obtención de plantas in vitro	22
Endurecimiento en invernadero	22
Desarrollo de plantas	23
Obtención de semillas	25

Determinación del nivel de ploidía de las plantas donadoras y obtenidas por cultivo de anteras	25
Técnica citogenética	25
• Colecta de raíces	26
• Hora de colecta de las raíces	27
• Pretratamiento	27
• Condición Hipotónica	28
• Proceso de Fijación	28
• Hidrólisis	29
• Proceso de Tinción	29
• Aplastamiento o squash	29
• Observación	29
Evaluación de homocigosis a través de marcadores moleculares	30
• Extracción de ADN	30
• Reacción en cadena de la polimerasa - PCR	31
• Visualización de amplificación	32
• Lectura de bandas, determinación de homocigosis	32
Realización de cruzamientos	33
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Glosario	41
Referencias	42



Generalidades

El género *Physalis* incluye alrededor de cien especies caracterizadas porque sus frutos están cubiertos por el cáliz. *Physalis peruviana* L., la especie más conocida del género, es originaria de los Andes, especialmente de Perú, Bolivia y Colombia; crece como planta silvestre y semisilvestre en las zonas de 1.500 a 3.000 m.s.n.m. (Fischer *et al.*, 2005). Su origen y diversificación se ubica en la cordillera de los Andes, principalmente de Colombia, Perú y Ecuador. Se encuentra desde Venezuela hasta Chile, a todo lo largo y ancho de la cordillera andina, pero sólo en Colombia se cultiva con fines comerciales donde posiblemente se inició el cultivo en la década de los años 80 y ha llevado al país a ser el primer productor mundial. El cultivo en Colombia se ubica principalmente en Cundinamarca, Boyacá, Antioquia, Nariño, Valle y Tolima.

Taxonomía

Nombre científico:	<i>Physalis peruviana</i> L.
Nombre común:	Uchuva
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Physalis</i>
Especie:	<i>Physalis peruviana</i> L.

Descripción de la especie

La especie *Physalis peruviana*, conocida como uchuva en Colombia, aguaymanto y capulí en sus orígenes peruanos, pertenece a la familia de las Solanáceas y al género *Physalis*, cuenta con alrededor de cien especies que se encuentran en estado silvestre y que se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho.



Las especies del género *Physalis* producen una baya succulenta y el cáliz es inflado vesiculoso el cual durante, la fructificación cubre completamente el fruto. La mayoría de las especies que se conocen en la actualidad concuerdan con la descripción de Linneo, quien caracterizó al género *Physalis* por la presencia de corolas rotáceas acampanuladas y péndulas, cáliz acrescente e inflado durante la fructificación y anteras con dehiscencia longitudinal (Ligarrero *et al.*, 2005). Cuatro especies se cultivan por su fruto: *Physalis peruviana* L., uchuva o cape gooseberry; *Physalis pruinosa* L., ground cherry, tomate de cáscara que se usan para mermeladas; *Physalis alkekengi* L., linterna china que se usa como ornamental y *Physalis ixocarpa* Brot., considerada sinónimo de *Physalis philadelphica*, (tomatillo, tomate de cáscara, usado como hortaliza y verdura para salsas (McCain, 1993).

Atributos, cualidades y usos principales

Physalis peruviana, es extremadamente rica en Vitamina A (648 UI / 100g) y tiene buenos contenidos de Vitamina C, (26mg), algunas del complejo de vitamina B, D y E., fibra (4.8g), proteínas (1.9g), fósforo, hierro, potasio y zinc. Se le han atribuido muchas propiedades medicinales tales como antiasmático, diurético, antiséptico, sedante, analgésico, fortifica el nervio óptico, alivia problemas de garganta, elimina parásitos intestinales y amebas; además se reportan sus propiedades antidiabéticas, recomendando el consumo de 5 frutos diarios. No existiendo estudios previos que indiquen sus posibles efectos. En diferentes regiones de Sudamérica se le atribuyen propiedades medicinales tales como las de purificar la sangre, disminuir la albúmina de los riñones, aliviar problemas en la garganta, fortificar el nervio óptico, limpiar las cataratas, ser un calcificador y controlar la amibiasis. Según el National Research Council, el jugo de la uchuva madura tiene altos contenidos de pectinasa, lo que disminuye los costos en la elaboración de mermeladas y otros preparativos similares.

La uchuva en el mundo

En Colombia, primer productor mundial de uchuva, seguido por Sudáfrica, no se han seleccionado variedades y solamente se conocen ecotipos o plantas procedentes de diferentes regiones o países, que



se diferencian por el tamaño, el color y el sabor, la forma del cáliz y el porte de la planta. Actualmente se cultivan tres tipos de uchuva originarias de Colombia, Kenia y Sudáfrica. La uchuva colombiana se caracteriza por tener una mejor coloración y mayor contenido de azúcares, características que la hacen más apetecible en los mercados. La uchuva crece como planta silvestre y semisilvestre en zonas altas entre los 1.500 y 3.000 m.s.n.m. Actualmente, la uchuva se encuentra en casi todos los altiplanos de los trópicos y en varias partes de los subtrópicos, incluyendo Malasia, China y el Caribe, Australia y Nueva Zelanda, entre otras.

La uchuva en Colombia: el cultivo

La planta de uchuva se ha convertido en un cultivo muy atractivo para el agricultor y el consumidor en Colombia y el exterior. Comúnmente se le llama uchuva, palabra que se deriva del vocablo indígena “ucuba”, que significa fruto o grano. A nivel nacional la producción de uchuva se lleva a cabo en los departamentos de Antioquia, Tolima, Boyacá y Cundinamarca, siendo este último el mayor productor de la fruta, con una participación del 80% en el total de la producción nacional, con rendimientos promedio de 19 ton.ha⁻¹ (Fischer, 2000). Según el ministerio de agricultura en el 2005, los productores de uchuva en Colombia se caracterizan por ser propietarios de la tierra que cultivan en forma individual en parcelas de 3 a 5 hectáreas, la mano de obra empleada es familiar y no tienen acceso a capacitación tecnológica que les permita incrementar su producción hasta niveles donde se garantice el bienestar del productor y por tanto se hagan más eficientes los agroecosistemas. Además la uchuva (*Physalis peruviana* L.) representó una de las especies con mayor proyección en exportación registrando un valor del 75.2 % en el mercado de frutas exóticas durante el 2008. (Legiscomex, 2008). En los últimos años la producción de uchuva en el país ha crecido significativamente. Entre los años 2004 y el 2008, el área cosechada disminuyó en un 0.35%, pasando de 844 hectáreas a 841, no obstante el rendimiento (kilogramos por hectárea), aumentó un 25.2%, pasando de 14.679 a 18.386, en el mismo periodo, demostrando un incremento en la productividad y eficacia en el manejo del cultivo. La producción en



Colombia se concentró con un 36.3% en el departamento de Boyacá, seguido por Antioquia con un 30.3% y Cundinamarca con un 28.4% (MADR, 2009).

Biología de la planta

Es una planta perenne, herbácea, arbustiva y fuertemente ramificada. Crece normalmente sin tutorado hasta una altura de 1 a 1,5 m. En plantas que se desarrollan con un tallo principal, se encuentran de 4 a 5 ramas productivas dominantes. Después de la maduración las hojas se amarillean y se caen. Las flores son solitarias y hermafroditas, son fácilmente polinizadas por insectos, el viento o autopolinización. Las raíces son fibrosas y se encuentran entre unos 10 y 15 cm de profundidad, el sistema radical es ramificado y profundiza con sus raíces principales hasta unos 50 cm, proporcionándole un buen anclaje a la planta. El desarrollo de raíces está relacionado con el tipo y textura del suelo, recomendándose un suelo arcillo arenoso. El tallo es herbáceo, cubierto de vellosidades suaves, color enteramente verde, con nudos y entrenudos. En cada uno de los nudos nace una hoja, que protege a un número de yemas que se desarrollan dando origen a ramas o tallos principales. Crece sin tutorado hasta una altura de 1,5 m aprox. Con poda y espaldera supera los 2,5 m., terminando su desarrollo vegetativo con la formación de una inflorescencia. Las hojas son simples, enteras y acorazonadas, dispuestas en forma alterna en la planta. El limbo es entero y presenta vellosidades que las hacen suaves al tacto, muy pecioladas y de tamaño variable. Las flores son solitarias, pedunculadas y hermafroditas, se originan en las axilas y están constituidas de una corola amarilla en forma tubular, originada en cinco pétalos soldados con cinco puntos morados en su base. El cáliz gamosépalo está formado por 5 sépalos persistentes, es velloso con venas salientes y una longitud de 4 a 5 cm que cubre al fruto durante todo su desarrollo. En su madurez se va tornando de color paja y traslucido, de textura apergaminada. Su importancia radica en que protege al fruto contra insectos, pájaros, enfermedades y situaciones climáticas extremas. Además de servir como una fuente de carbohidratos durante los primeros 20 días del crecimiento del fruto (Fischer y Angulo, 1999). El fruto es una baya



jugosa en forma de globo u ovoide con un diámetro entre 1,25 y 2,15 cm con un peso de 4 a 10 gr que contiene unas 100 a 300 semillas. Su estructura interna es similar a la de un tomate en miniatura. La baya varía de color amarillo al ocre o amarillo naranja cuando madura, su piel es delgada y lustrosa y está recubierta con un cáliz. Su sabor varía desde ácido hasta muy agrio. Se consume al natural, en ensaladas, helados y tartas. Es un fruto muy rico en vitaminas. Con las siguientes características: Peso (g): 3.29; Volumen teórico (cm³) 3.39; Esfericidad 0.98; Color semilla Amarillo; % Pulpa: 70, % Cáscara: 3,5; % Semilla: 26,5; Forma de semillas redondeadas y aplanadas; Promedio semillas/fruto: 179.

Morfología de la flor de uchuva

Las flores de *P. peruviana* son pentámeras, hermafroditas solitarias y pedunculadas; se ubican en las axilas de las ramas; la corola es glabra por dentro, con una línea de pelos por fuera y con bordes ciliados (Lagos *et al.*, 2008). Los estambres son cinco, las anteras tienen dehiscencia longitudinal, pueden ser púrpuras, azules, o azules con líneas amarillas, polen tricolporado, oblato o prolato, ovario con estilo filiforme, estigma claviforme, algunas veces capitado (Ligarreto *et al.*, 2005). La flor es perfecta y completa como se indica en la figura 1.

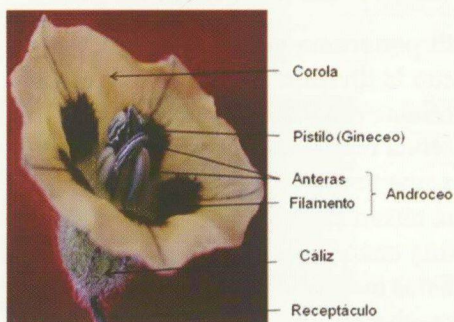


Figura 1. Morfología y componentes de la flor de uchuva.

La antera

La antera hace parte de los estambres los cuales son la parte masculina de la flor, ésta presenta 6 estambres y cada uno tiene una antera. En cada antera se encuentran los granos de polen. Al hacer un corte trasversal en la antera joven se aprecia un tejido conectivo

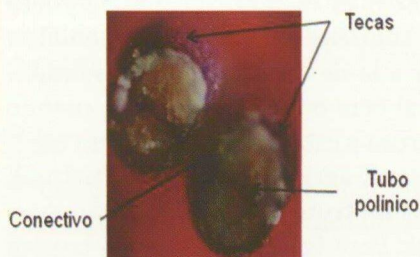


Figura 2. Corte transversal de una antera mostrando las dos tecas, el saco polínico y el tejido conectivo.

(al centro), por donde se conecta al filamento, y cuatro cavidades denominadas sacos polínicos; dos de ellas son anteriores y dos posteriores. Cuando ya se han formado los granos de polen, el saco anterior forma una sola cavidad con el respectivo saco posterior, de manera que la antera queda compuesta por solo dos cavidades, denominadas tecas (Figura 2).

Desarrollo del grano de polen

El panorama general del proceso de microsporogénesis se inicia con la división de una célula diploide, dando lugar a la inicial. Las células esporógenas, están recubiertas por el tapete que nutre a la célula madre del polen. Las células esporógenas meiosis, dan lugar a una tétrada de las células haploides. Las células individuales de la tétrada se liberan, quedando microsporas libres por la acción de una enzima (callosa) producida por la capa de tapete de la antera. Estas microspóras uninucleadas sufren una división mitótica, lo que resulta en un grano de polen que contiene dos núcleos: el núcleo vegetativo, de mayor tamaño y uno más pequeño generativo. En 70% de las familias de plantas (por ejemplo, Solanaceae y Liliaceae), el grano de polen se libera de la antera cuando consta sólo de estos dos núcleos, la segunda división mitótica del núcleo generativo, se produce mientras que el tubo polínico crece a través del pistilo. En otros familias de plantas (por ejemplo, Crucíferas y gramíneas), esta segunda división mitótica se produce antes de que el polen se desprende de la planta (McCormick, 2004). En uchuva el proceso ocurre como se indica en la figura 3. El grano de polen generalmente alcanza su madurez cuando acumula gránulos de almidón como se observa en la figura 4A. En este estado el gran de polen se considera desarrollado maduro viable para la germinación, como se indica en la figura 4B.

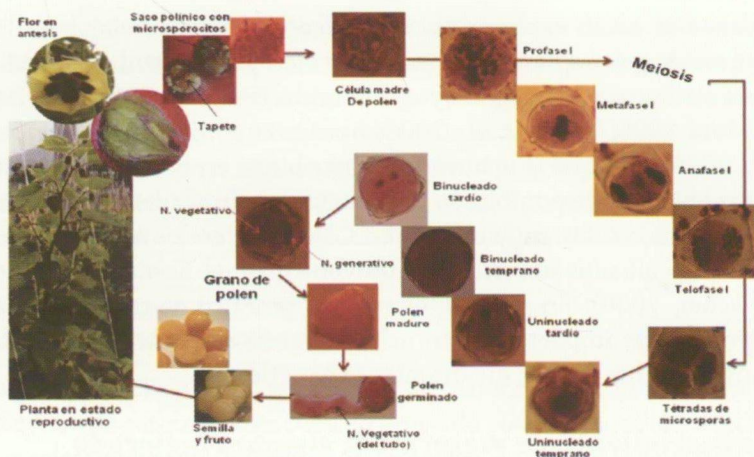


Figura 3. Proceso de la microsporogénesis y desarrollo del grano de polen de uchuva

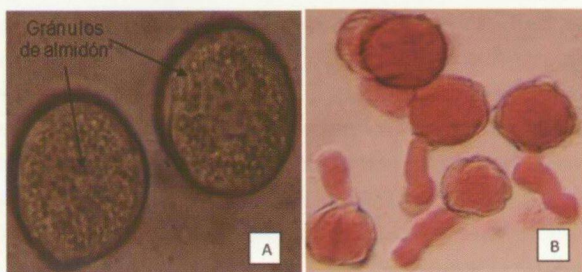


Figura 4. Grano de polen maduros con presencia de gránulos de almidón y germinación mostrando el tubo polínico.

Reproducción, Genética y Genotipos existentes

La uchuva se reproduce por medios sexuales en los que existen la autogamia y la alogamia. Esto quiere decir que las flores son fácilmente polinizadas por el viento e insectos, especialmente abejas, y que la autopolinización también ocurre (CRFG, 1997). Lagos (2008), considera que bajo las condiciones ambientales en Colombia, la polinización es 50% autógama y 50 % alógama. La genética de la uchuva es poco conocida, la variabilidad genética y su estructura poblacional



apenas se están explorando. Las colecciones conservadas en los bancos de germoplasma del país, han sido parcialmente evaluadas para atributos morfológicos y agronómicos (Pulgarín 1989; Arbeláez y Mora 1990; Lagos *et al.*, 2003; Bonilla *et al.*, 2005; Ligarreto *et al.*, 2005). Aunque la uchuva está distribuida en el mundo y existe germoplasma disponible, la existencia de variedades comerciales declaradas, es aún muy escasa. En Colombia, en los años ochenta, fueron evaluados dos ecotipos provenientes de Kenia y Sudáfrica (Fischer, 2000). En general, el análisis genético de características agronómicas importantes en uchuva puede entregar información muy relevante para el mejoramiento genético.

Requerimiento de material de siembra mejorado

La semilla, en todo proceso agrícola es la parte esencial para el éxito de la producción y calidad de un cultivo comercial. Para la obtención de semilla de alta calidad genética se requiere la generación de genotipos superiores. En Colombia a finales de la década de los ochenta se introdujo al departamento de Boyacá dos ecotipos africanos, procedentes de Kenia y Sudáfrica. Almanza y Fischer (1993) los compararon con el ecotipo originario de Colombia y diferenciaron cada fruto por el tamaño, color y la forma del cáliz. El fruto de procedencia Colombiana tiene una mejor coloración y un mayor contenido de azúcares, cualidad que lo hace apetecible en el mercado. En cuanto a su hábito, el ecotipo Sudáfrica presenta un porte bajo con las hojas grandes, mientras que el Colombia es alto con las hojas pequeñas. Verheij y Coronel (1991) informan que en Australia la uchuva se comercializa bajo los nombres de cultivares, como por ejemplo *Golden Nugget* o *New Sugar Giant*, los cuales producen frutos grandes, pero con un sabor más bien insípido. Los tipos con frutos más pequeños, tienen un mejor sabor y otros tipos de procesamiento. De Estados Unidos, Wolff (1991) reporta tres variedades comercialmente importantes: *Peace*, *Giant Groundcherry* y *Goldenberry*, mientras la CRFG (1997) describe cinco variedades: *Giallo Grosso*, *Giant*, *Giant Poha Berry*, *Golden Berry* y *Golden Berry -Long Ashton*. En Colombia existe una gran brecha en relación con el desarrollo de variedades mejoradas y los materiales que existen en producción comercial son el resultado



de la selección por parte de los agricultores a partir de materiales silvestres o introducidos. En el país existen cuatro colecciones que han sido caracterizadas en algunos casos por caracteres morfoagronómicos y en otros casos, por marcadores moleculares. A pesar de estos esfuerzos, aún falta el establecimiento de un programa de generación de variedades e híbridos que garantice una respuesta sostenible que llene las expectativas tecnológicas de producción y calidad de acuerdo con las exigencias del mercado nacional e internacional.

El mejoramiento tradicional

La primera actividad en un proceso de mejoramiento genético es la colección de germoplasma o sea un grupo de plantas que se identifican y se seleccionan por sus atributos deseables. Entonces, la selección ya sea por agricultores o por investigadores, es un proceso fundamental en la obtención de genotipos o material de siembra de superior calidad. Es decir, material de siembra sano, más vigoroso, resistente a plagas y enfermedades, tolerantes a condiciones adversas del clima y suelo, mejor calidad de fruto y mayor producción. Aunque los métodos convencionales son la plataforma para producción de nuevos genotipos superiores, los procedimientos son lentos y muy laboriosos. En el cultivo de uchuva en Colombia, el mejoramiento genético, en realidad no existe como actividad estructurada. Existen algunos proyectos muy aislados con resultados muy preliminares y a nivel comercial aún no se cuenta con variedades ni híbridos. El cultivo de anteras como parte de la biotecnología puede complementar los procesos del mejoramiento para acortar el tiempo de obtención de nuevos genotipos.

La biotecnología

La biotecnología como actividad humana es tan antigua como las actividades de la agricultura realizadas por el ser humano. Las tecnologías biológicas o de la vida utilizan los organismos vivos o parte de ellos para generar procesos y productos para el beneficio de la sociedad y el ambiente. Entre estas tecnologías el cultivo de tejidos vegetales o cultivo in Vitro de plantas, ofrece la posibilidad de cultivar anteras en condiciones de laboratorio para obtener plantas a partir de granos de polen inmaduro contenidos en la antera.



El cultivo de anteras

Es una técnica de la biotecnología por medio de la cual es posible producir plantas completas puras que se originan de granos de polen inmaduros llamados microspóras cultivando las anteras en un medio nutritivo en condiciones de laboratorio. Por medio de esta técnica se logra obtener un material genético puro y uniforme en un solo ciclo de cultivo in vitro. Por el contrario, los medios convencionales requieren entre 6 y 8 generaciones de autofecundación para alcanzar una pureza genética u homocigosis que nunca es del 100%.

Aplicaciones del cultivo de anteras en mejoramiento genético de plantas

Las plantas doble haploides fértiles que se obtienen por medio del cultivo in vitro de anteras son homocigotas que a su vez resultan en líneas realmente puras. Estas líneas podrían ser usadas directamente para ensayos de rendimiento y pruebas agronómicas o para la producción rápida de híbridos comerciales.

Aunque las plantas que se producen en el laboratorio (R1) podrían utilizarse para iniciar el proceso de evaluación y selección y sin embargo aunque las plantas que se producen en el laboratorio (R1) podrían utilizarse para iniciar el proceso de evaluación y selección, es posible que tengan algún efecto del cultivo in Vitro. En ese caso lo más recomendable es realizar un paso sexual y obtener las plantas R2. Las plantas R2 las constituyen las plantas derivadas de las semillas de las plantas R1. Cosechando toda la semilla de cada planta R1, se pueden generar plantas para evaluación para resistencia a enfermedades, tolerancia a limitantes de suelo y clima, a calidad de fruto y producción en diferentes localidades. Lo recomendable entonces es empezar la evaluación con las plantas R2.

PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CULTIVO DE ANTERTAS EN UCHUVA

La producción de plantas in Vitro está influenciada por los siguientes factores: El genotipo, las condiciones ambientales y el estado fisio-



lógico de las plantas donantes, el estado de desarrollo del polen al iniciarse la siembra de las anteras, el tratamiento de las anteras antes o después de establecidas en el medio de cultivo y las condiciones físicas de incubación de las anteras.

Selección de las plantas donadoras de botones florales

Uno de los factores determinantes en la obtención de plantas con el cultivo de anteras es la calidad fisiológica y fitosanitaria de las plantas donadoras de las flores inmaduras o botones florales. En uchuva como cualquiera otra especie, se requieren plantas vigorosas, sanas y de buena producción que garanticen el vigor de las microspóras y por consiguiente la respuesta *in Vitro*.

Las plantas vigorosas, con buena producción de frutos y fisiológicamente sanas, tienen mayor capacidad de respuesta que las plantas con deficiencia nutricional o con algún problema fitosanitario. Teniendo en cuenta estos factores, se escogen plantas vigorosas, con buena producción de frutos, libres de enfermedades e insectos plagas, especialmente aquellas que estén en primera cosecha (Figura 5).



Figura 5. a. Planta muestreada, b. flor de una planta vigorosa de uchuva, c y d. frutos de uchuva.

Determinación del estado de desarrollo del polen

Para este trabajo se muestrearon cultivos comerciales de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, donde se seleccionaron de 5 y 10 plantas por cultivo, a las cuales se les realizó la respectiva caracterización morfoagronómica y a su vez se tomaron muestra de frutos y esquejes para enraizar, con el objetivo de tener una in-



formación completa de las plantas donantes, lo cual permite hacer una comparación luego con las plantas generadas por la técnica del cultivo de anteras *in Vitro*.

Desarrollo floral y la relación con el estado de desarrollo de las microspóras

El estado de desarrollo de las microspóras es otro de los factores críticos para generar una respuesta óptima. Se considera que los estados de desarrollo uninucleado tardío y binucleado temprano de las microspóras son los más propicios para obtener la mejor respuesta de las anteras en cultivo *in Vitro*. En estos estados se da la primera división mitótica y se puede presentar la división espontánea de las microspóras que da paso a la generación de la estructura multicelular y finalmente el embrión. Para determinar este estado de desarrollo en la microspóras de uchuva, se realizó una comparación entre la medida longitudinal de los botones florales y el estado de desarrollo de las microspóras contenidas en las anteras mediante observación del tejido teñidos con colorantes específicos.

Se tomaron botones florales de diferentes tamaños, desde 4 a 12 mm de longitud colectados el mismo día de selección de las plantas donantes; estos botones fueron sumergidos en una solución fijadora la cual se preparó con 3 partes de etanol absoluto y 1 parte de ácido acético glacial durante 24 horas a temperatura ambiente.

Para la tinción con orceina o acetocarmin al 2%, se extrajeron las anteras sobre un portaobjetos, a las cuales se les agregó de 2 a 3 gotas del colorante, seguidamente con la cabeza de un clavo de hierro se les realizó una sobre presión hasta sacar el contenido de las anteras, por último se removió el exceso del producto de tinción y se colocó el cubre objeto para visualizar en el microscopio con lente de 40X y 100X (Figura 6).

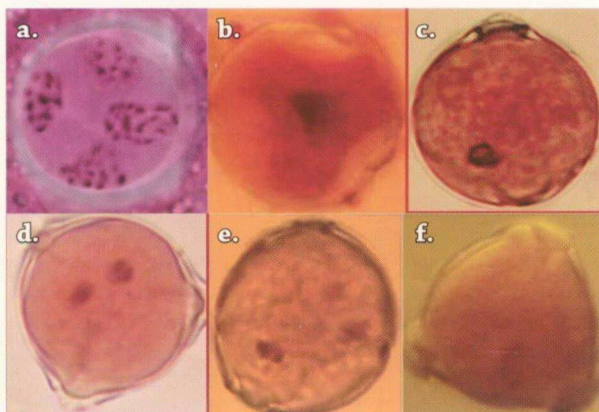


Figura 6. Estados de desarrollo de la microspóras en uchuva.
a. Estado de tétrada, b. Uninucleado temprano, c. Uninucleado tardío, d. Binucleado temprano, e. Binucleado tardío y f. grano de polen maduro (aumento 100X).

Teniendo en cuenta el tamaño del botón floral y el estado de las microspóras, se realizó un análisis con el fin de identificar el tamaño ideal como marcador visual para la colección de los botones florales en campo y obtener la respuesta esperada en cuanto a la formación de embriones (Tabla 1). Aunque puede haber variación en la relación de los parámetros, es un buen indicador que permite agilizar el muestreo para favorecer el estado fisiológico de los botones florales después de ser colectados.

Tabla 1. Correlación entre el estado del polen y el tamaño del botón floral.

Tamaño de flor (mm)	ESTADO				
	Tetrada	Uninucleado temprano	Uninucleado tardío	Binucleado Tardío	Binucleado Temprano
4	X				
8	X				



8		X			
9	X				
10			X		
10			X	X	
12			X	X	
12				X	

Colecta y pretratamiento de los botones florales de las plantas

La colecta de los botones florales de las plantas previamente seleccionadas, se realizó teniendo en cuenta el tamaño longitudinal establecido (Figura 7), para esto se utilizaron bolsas de papel aluminio marcadas con la respectiva planta muestreada, donde se almacenaron todos los botones florales colectados, finalmente fueron transportados al laboratorio en neveras con hielo con el fin de conservar la viabilidad de las anteras.



Figura 7. Tamaño óptimo de los botones florales a coleccionar.

El material colectado fue incubado a 4°C durante tres tiempos 24, 48 y 72 horas como pretratamientos, bajo condiciones de oscuridad (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de los pretratamientos

PRETRATAMIENTO	CONDICIONES
T1	Exponer los botones florales a 4°C durante 24 horas antes de introducir <i>in vitro</i>
T2	Exponer los botones florales a 4°C durante 48 horas antes de introducir <i>in vitro</i>
T3	Exponer los botones florales a 4°C durante 72 horas antes de introducir <i>in vitro</i>



Estas condiciones de estrés con temperaturas por periodos de tiempo determinados, ayudan a que se dé el cambio en la vía normal de desarrollo de gameto y tome la vía de desarrollo de esporofito. Es decir, el gameto por acción del estrés y del medio de cultivo se convierte en un embrión el cual luego da origen a un nuevo individuo.

Desinfección superficial de los botones florales y siembra de las anteras en medio de cultivo

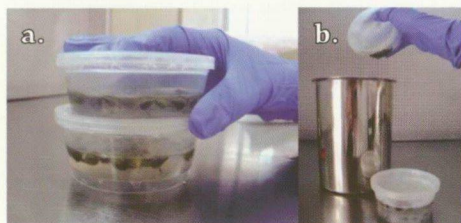


Figura 8. a. Desinfección superficial en cámara de flujo laminar con solución de hipoclorito de sodio en agitación constante y b. lavados de las antera con agua destilada estéril

Los botones florales fueron lavados previamente con jabón antibacterial y agua destilada y en condiciones de cámara de flujo laminar se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2 % más 2 gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución, durante 15 minutos y en agitación contante: Finalmente, se

realizaron 4 enjuagues con agua destilada estéril, conservando los botones en el último enjuague (Figura 8).

Una vez desinfectados los botones florales se realizó la extracción de las anteras haciendo un corte en la base del botón floral y con una suave presión se aislaron las anteras (Figura 9), estas fueron establecidas en los diferentes medios de cultivo a evaluar y finalmente se incubaron a 28 °C en condiciones de completa oscuridad.



Figura 9. a. Extracción de las anteras y b. siembra de las anteras en medio de cultivo.



Obtención de plantas *in Vitro*

Después de 60 a 90 días de sembradas las anteras se observaron embriones que salen del interior de la antera: Inicialmente se presentan estructuras globulares, las cuales van cambiando a los respectivos estados de corazón, torpedo y cotiledonar. En este último estado, se hace la colecta de los embriones y se establecen en el medio de germinación, bajo condiciones de luz, manteniendo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad en el cuarto de crecimiento a 28°C.

Los cambios en el interior de las anteras fueron observados con el fin de determinar el tiempo estimado en cada uno de estos estados. Se asignó como cero días el estado globular, a los 12 días se observó el cambio al estado de corazón, el estado de torpedo ocurrió a los 19 días y cotiledonar a los 23 días. En este último estado se observaron los cotiledones y el domo apical bien definidos y los embriones fueron sembrados en el medio de cultivo de germinación. Al cabo de 30 días, los cotiledones inician la conversión a planta tomando pigmentación verde y se puede observar la aparición de las primeras raíces hasta llegar al desarrollo de una plántula completa a los 40 días (Figura 10).



Figura 10. Estados de desarrollo del embrión. a y b Estructura globular, c. Corazón, d. Torpedo, e. Cotiledonar, f. Embriones en medio de germinación y g. Planta completamente desarrollada.

Endurecimiento en invernadero

Las plantas generadas a partir de los embriones, son multiplicadas con el objetivo de tener copias de seguridad en condiciones *in Vitro* y tener clones de cada individuo para realizar análisis moleculares, citogenéticos y el respectivo proceso de aclimatación en condiciones de invernadero. Para este último, se extraen las plantas del medio



de cultivo y se realiza el lavado de las raíces con agua de grifo, eliminando completamente los residuos de medio de cultivo ya que esto puede generar contaminación.

Las plantas son sembradas en bandejas con turba canadiense previamente autoclavada y humedecida a capacidad de campo. Una vez sembradas todas las plantas, fueron tapadas con plástico transparente, generando una cámara húmeda semejando las condiciones que tenían las plantas en condiciones *in Vitro*. Después de 5 días las plantas se destaparon y se dejaron aclimatar totalmente bajo las condiciones *ex Vitro* en invernadero (Figuras 11).



Figura 11. a. Lavado y eliminación del medio de cultivo de las raíces de las plantas a endurecer, b. cámara húmeda en el proceso de aclimatación y c. plantas completamente aclimatas.

Desarrollo de plantas

Después de 15 días de aclimatadas, las plantas son trasplantadas a bolsas con un sustrato compuesto por una mezcla de 2 de suelo por 1 de cascarilla de arroz. En estas condiciones, al cabo de 75 a 90 días se observan las primeras flores en las plantas (plantas R1).

Entre las plantas R1 se observaron plantas estériles con tallo delgado, hojas y flores pequeñas, a su vez las flores tienen estigma excerto, comparado con las plantas fértiles que presentan un tallo más grueso, las hojas y las flores son más grandes. Estas flores a diferencia de las estériles, presentan el estigma inserto y se da el proceso de polinización normal, donde se observa el llenado y maduración del fruto (Figura 12).



Por naturaleza las plantas de uchuva tienen un juego de cromosomas que viene de la mamá y otro que viene del papá y se denominan $2n$ o diploides. De acuerdo con el análisis citogenético de las plantas producidas por cultivo de anteras, hay plantas con un número de cromosomas de $n=24$, o sea que tienen un solo juego de cromosomas igual al número de cromosomas del grano de polen. En cambio las plantas fértiles tienen $2n=48$ o sea que el número de cromosomas del grano de polen se ha duplicado durante el proceso *in vitro*. Esto indica que las plantas estériles son haploides o $n=24$ y las plantas fértiles son haploides dobladas o doble haploides $2n=48$. Por lo tanto las plantas fértiles son genéticamente puras. Además, se observó que el polen de las plantas estériles no tiñe con los colorantes orceína y acetocarmín. Esto es un indicador de inviabilidad, razón por la cual las flores de estas plantas no se polinizan, fenecen y se desprenden de la planta.



Figura 12. Plantas obtenidas por cultivo de anteras. a, b y c, Planta estéril con tallo delgado, hojas y flores pequeñas, estima exserto y senescencia del tejido floral; d, e y f, plantas fértiles con tallos gruesos, hojas grandes y flor con estigma inserto lo cual facilita la autopolinización y por ende hay cuajado del fruto.



Obtención de semillas

Las plantas R1 fértiles se autopolinizaron para asegurar que los frutos obtenidos fueran de la planta y no producto de polinización cruzada y así obtener semilla R2 pura. A los frutos, cosechados se le extrajeron las semillas. A estas semillas se les hizo prueba de germinación y se obtuvo un 100% de viabilidad (figura 13).



Figura 13. a y b. frutos colectados de las plantas R1 y c. semillas R2 extraídas de los frutos.

Determinación del nivel de ploidía de las plantas donadoras y obtenidas por cultivo de anteras

Ploidía es un término que hace referencia al número de grupos o “juegos” de cromosomas que posee una célula. El número de cromosomas y el nivel de ploidía es una información útil en el estudio de una especie y en la caracterización del germoplasma. Esto se debe a que gran parte de los rasgos citológicos se explican a través de las características reproductoras y evolutivas de las especies. El estudio de las células en división aportó información sobre las estructuras semejantes a hilos llamadas cromosomas. Estos están compuestos de ADN y proteínas. En las células somáticas se encuentran dos juegos de cromosomas homólogos, cada uno de los cuales proviene de uno de sus progenitores masculino y femenino, esta condición se denomina diploide. Las especies con más de dos juegos de cromosomas en las células somáticas se denominan poliploides.

Técnica citogenética

El número de cromosomas y en consecuencia el nivel de ploidía de una especie, se puede determinar tanto por métodos directos como indirectos. La mayoría de autores concuerdan en que el conteo de



cromosomas en células meristemáticas, es el método más eficiente para determinar el nivel de ploidía. Con la técnica del aplastado o “squash” de puntas de raíz se ha logrado conocer el número cromosómico de diferentes especies vegetales. Esta metodología comprende desde la obtención de raíces hasta la observación al microscopio óptico (Figura 14).

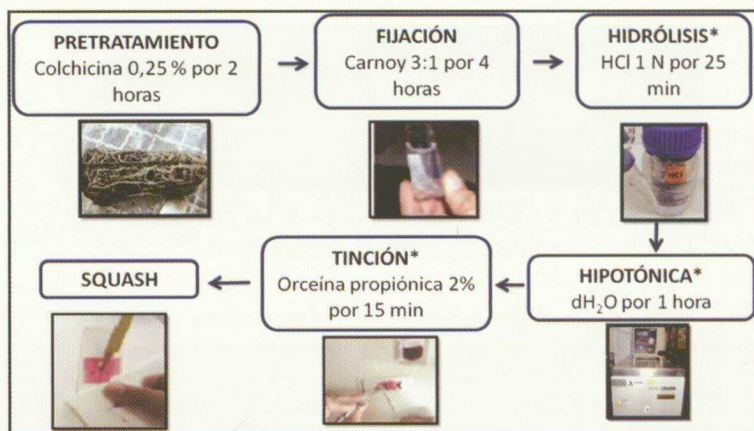


Figura 14. Resumen del proceso de la técnica citogenética en uchuva.

• Colecta de raíces

Las células de un organismo poseen cromosomas visibles durante la división mitótica o meiótica. Por lo tanto, para realizar el conteo de cromosomas mitóticos se deben utilizar tejidos meristemáticos que se encuentren en constante mitosis o división celular, con núcleos grandes e indiferenciados. En la zona apical de la raíz se encuentran este tipo de tejidos por lo que se usan ampliamente en citología para el recuento y análisis de cromosomas mitóticos. Las raíces pueden obtenerse por germinación de las semillas sexuales



Figura 15. Plantas de uchuva mantenidas bajo condiciones de invernadero e *in vitro* para la colecta de raíces.



o mediante enraizamiento de esquejes, brotes u otros órganos en un sustrato apropiado. La colecta de las raíces mantenidas en condiciones de invernadero se realiza en plantas pequeñas entre 5 a 10 cm de altura, las cuales deben estar previamente regadas (Figura 15).

• Hora de colecta de las raíces

Las plantas coordinan su fisiología y por tanto su reproducción con la información del ambiente que las rodea. La hora más apropiada para el tratamiento de las raíces depende de dos factores, la luz y la temperatura. De esta manera, un paso previo al pretratamiento es la determinación del índice mitótico, es decir, la hora en que se encuentran mayor número de células en división ante unas condiciones de luz y temperatura (Figura 16). Para esto, se toman las raíces durante cada hora del día, y se fijan en una mezcla de alcohol absoluto y ácido acético glacial (3:1 v/v). Luego se coloca una gota de un colorante, se coloca un cubreobjetos y se hace un aplastamiento del tejido con la ayuda del borrador de un lápiz para finalmente observar al microscopio óptico. Se registran el número de células en interfase, profase, metafase y telofase por cada hora de colecta. Luego de ordenar esta información se tiene una idea de la hora de colecta.

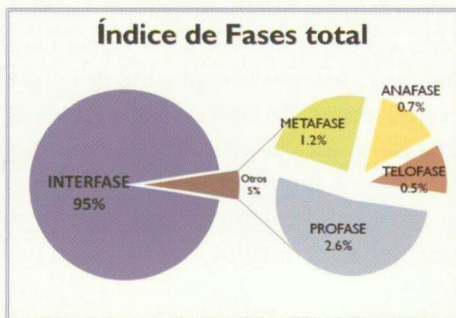


Figura 16. Ciclo celular de uchuva, se observa el porcentaje de células en cada una de las fases de mitosis en un periodo de 24 horas.

• Pretratamiento

Una vez se ha determinado la hora en la cual se encuentran mayor número de células en metafase es necesario realizar un tratamiento para inhibir la mitosis. En la metafase, los cromosomas se individualizan y llegan al máximo grado de condensación, permitiendo distinguir su forma característica con lo cual se pueden clasificar morfológicamente. El agente químico empleado como inhibidor es



una solución de colchicina, ésta actúa sobre la formación del huso acromático impidiendo el paso hacia anafase, además de acortar y dispersar los cromosomas (Talledo *et al.*, 1993).

Usando una pinza se colectan las raíces y se colocan en un frasco protegido de la luz, este debe contener colchicina al 0,25% diluida en solución de DMSO al 2%. Las raíces son dejadas en esta solución por dos horas a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C).

• Condición Hipotónica

Una célula sumergida en una solución con una concentración más baja de materiales disueltos está en un ambiente hipotónico, la concentración de agua es más alta fuera de la célula que dentro, en estas condiciones el agua circula hacia el interior de la célula. El efecto del agua como solución de menor concentración de materiales disueltos es permitir el hinchamiento de la célula sin que esta se destruya debido a la resistencia de la pared celular. Sin embargo, con posteriores procesos se logra la explosión de la célula con lo cual se dispersan los cromosomas. En este caso se emplea agua destilada desionizada por una hora, ésta al estar libre de minerales se convierte en un agente hipotónico importante que permite el incremento del volumen de la cantidad de elementos al interior de la célula con lo cual, posteriormente, se facilita la separación de los componentes celulares.

• Proceso de Fijación

La solución de fijación interrumpe los procesos de las células con el fin de conservar la estructura fina de las mismas, además de permitir la posterior tinción de la cromatina -sustancia que forma los cromosomas (Sharma y Sharma, 1991). Aquí se emplea una solución compuesta de alcohol absoluto y ácido acético glacial (3:1 v/v). Esta solución permite la preservación del tejido sin distorsionar la estructura celular. El etanol permite la fijación del citoplasma y del jugo nuclear además de causar la contracción celular la cual es compensada por el hinchamiento causado por el ácido acético asimismo, este último estabiliza las proteínas asociadas con el ADN. La solución alcohol – ácido acético se emplea por mínimo 4 horas a 4 °C y máximo 48 horas.



• Hidrólisis

La pared celular y las uniones intercelulares deben ser destruidas para lograr que los cromosomas sean visibles en un solo plano, evitando de esta manera la superposición, lo cual dificulta el conteo y la determinación de la morfología. Un agente químico útil en este propósito es el ácido clorhídrico quien debilita las uniones intercelulares y facilita la separación de las células durante el aplastamiento. Se emplea una solución en concentración uno normal durante 25 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de hidrólisis se hacen lavados con agua destilada con el fin de eliminar restos de ácido impregnados en las raíces.

• Proceso de Tinción

El análisis de la estructura y número de cromosomas se analiza en microscopio óptico. Para tal fin se emplean tintes básicos que reaccionan ante la naturaleza ácida de la cromatina permitiendo su coloración y posterior visualización. Los colorantes más empleados incluyen acetocarmín y orceína propiónica.

Los ápices de las raíces se cortan y se colocan sobre un portaobjetos para facilitar los pasos posteriores. Luego se adicionan dos gotas del colorante elegido y se deja actuar por 15 minutos sobre la punta de raíz.

• Aplastamiento o squash

Luego de teñir las puntas de la raíz se coloca un cubreobjetos y se dan pequeños golpes sobre éste con el borrador de un lápiz. Los golpes permiten la separación de las células de la punta de la raíz y de los cromosomas.

• Observación

Una vez se realiza todo el procedimiento se cuenta con las laminas listas para ser observadas en microscopio óptico (Figura 17).

Una vez se ha realizado el proceso citogenético se cuenta el número cromosómico tanto de plantas donantes como de plantas regenera-



das. Con el método de producción de plantas por medio del cultivo de anteras se han observado plantas tanto estériles como fértiles. Aquellas plantas que han mostrado fertilidad presentan un número cromosómico $2n$ igual al número de cromosomas obtenido en las plantas donantes, mientras que las plantas estériles presentan la

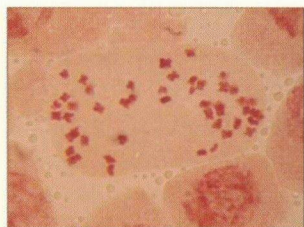


Figura 17. División celular en Metafase de uchuva

mitad de este número (Tabla 3). El código del material donante corresponde a un sistema alfanumérico, las letras hacen referencia a la finca en que se hizo la toma de muestras y el número a la planta seleccionada en campo para la colecta de anteras. De los materiales EE3 y LE1 se regeneraron 2 plantas, y de los materiales B4 y B5 una planta por cada uno.

Tabla 3. Número cromosómico de plantas donantes y regeneradas a partir del cultivo de anteras

DONANTE	NÚMERO CROMOSÓMICO	REGENERADA	NÚMERO CROMOSÓMICO
EE3	$2n=48$	EE3-H	$n=24$
LE1	$2n=48$	LE1-A9	$2n=48$
	$2n=48$	LE1-A11	$n=24$
B4	$2n=48$	B4-P2	$2n=48$
B5	$2n=48$	B5-1	$n=24$

Evaluación de homocigosis a través de marcadores moleculares

• Extracción de ADN

El ADN es la molécula que contiene el diseño de todas las formas de vida de la Tierra. Las instrucciones que dirigen la vida de todas las células de un organismo y confieren a cada una sus características especiales están en esta molécula. El ADN también permite a los organismos o a las células de un organismo transmitir la información con precisión de una generación a la siguiente.



La extracción del ADN consiste en la separación de este de los demás componentes de la célula o del ambiente del cual se tomó la muestra. Esta incluye una lisis o rotura de la pared celular para liberar el ADN del interior celular. Posteriormente se realiza la eliminación de contaminantes como proteínas y fenoles (Figura 18). Finalmente para obtener el ADN se realiza una precipitación y limpieza del mismo, con etanol y ARNasa, una enzima que elimina otro tipo de ácido nucleico llamado ARN.



Figura 18. Tejido foliar para maceración y extracción de ADN

• Reacción en cadena de la polimerasa - PCR

Una región particular en el ADN es multiplicada varias veces a través de un procedimiento conocido como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para esto es necesario contar con las secuencias o marcadores en los extremos de la zona de interés. Estos marcadores hacen referencia a cualquier diferencia existente en la secuencia de ADN entre individuos.

La PCR consiste en una serie de ciclos que involucran cambios de temperatura con lo cual la doble cadena de ADN es reducida a cadenas sencillas, luego es unida a marcadores específicos que permiten una extensión de la cadena de ADN para finalmente obtener un

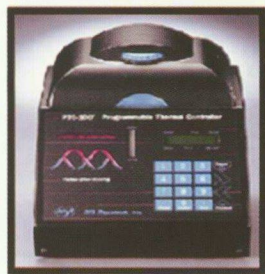


Figura 19. Termociclador empleado en el procedimiento de amplificación del ADN por PCR.



fragmento multiplicado. Este procedimiento se realiza en un equipo llamado termociclador (Figura 19).

• Visualización de amplificación

Los fragmentos obtenidos en la PCR son visualizados a través de una electroforesis, la cual permite separar las regiones multiplicadas de acuerdo al tamaño de cada una (Figura 20). Para tal fin se emplean geles con agujeros a través de los cuales pasan los fragmentos o regiones multiplicadas. Los fragmentos de menor tamaño pasan primero mientras los de mayor tamaño migran a menor velocidad. Cada una de estas fracciones es visualizada como bandas en el gel.

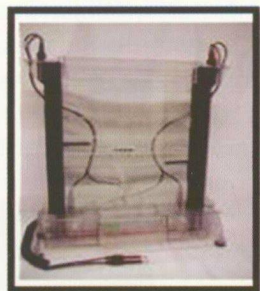


Figura 20. Cámara de electroforesis para la visualización de los productos de la PCR

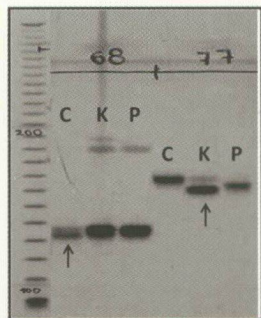


Figura 21. Gel de poliacrilamida con dos marcadores polimórficos. Las letras representan cada uno de los ecotipos amplificados: C, Colombia; K, Kenia y P, Perú. En el primer carril aparece un marcador de peso para la identificación del peso de las bandas.

• Lectura de bandas, determinación de homocigosis

Las bandas obtenidas por cada gel se comparan para establecer si existen diferencias entre los individuos que ellas representan (Figura 21).

El análisis de las bandas de ADN es muy útil, primero, para confirmar que las plantas se originan de los granos de polen inmaduro y segundo, para determinar el estado homocigoto de las plantas fértiles obtenidas. Para esos propósitos se usaron los marcadores 77, 126 y 146. El marcador 77 es polimórfico al amplificar una banda única para el ecotipo Kenia. Cuando se emplea este marcador en la amplificación de las plantas donantes y de las plantas obtenidas *in Vitro*, se observa un patrón de bandas similar al ecotipo Colombia. En cuanto a homocigosis de las plantas *in*



Vitro se observan dos bandas, tanto para las plantas con 24 cromosomas como para las plantas con 48 cromosomas. Los marcadores 126 y 146 son monomórficos en los tres ecotipos, es decir, con este marcador no se pueden diferenciar los genotipos. Sin embargo, presentan dos bandas claramente diferenciadas por lo cual son útiles para determinar homocigosis al compararse el material donante y el material regenerado. Lo anterior se deduce del supuesto que si el material donante presenta dos bandas indicaría heterocigosis, mientras que el regenerado que se espera sea homocigoto solo presentaría una banda. Pese a la diferencia en el número cromosómico del material *in Vitro*, se observó un patrón de bandeo similar al material donante. Lo cual sugiere que para este experimento los marcadores moleculares no estarían determinando la diferencias entre donantes y plantas *in vitro* (Figura 22).

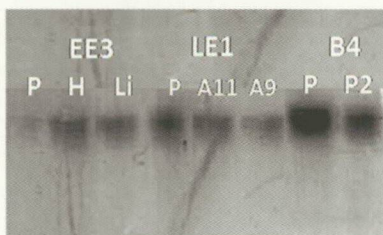







Figura 22. Amplificación con el marcador 77 en el material control, donante y regenerado. Los códigos arriba hacen referencia al nombre del material. Las letras P, parental; H, Li, A11, A9 y P2 son materiales regenerados. De los materiales EE3 y LE1 se regeneraron 2 plantas, y del material B4 una planta.

Realización de cruzamientos autógama y alógamas

El gran valor de las líneas puras en especies alógama o prevalentemente alógama, es su utilización en la producción de cruces o híbridos con fines comerciales. Con la obtención de líneas puras por medio del cultivo de anteras, en uchuva se abren las puertas para obtener híbridos comerciales para apoyar la sostenibilidad y mejoramiento del cultivo en Colombia. Uno de los resultados del proyecto fue la obtención de cruces entre varias líneas puras obtenidas en el laboratorio con el fin de evaluar la producción de semilla y posteriormente el comportamiento de estos híbridos a nivel de uniformidad de las plantas y del fruto. En la tabla 4 se presentan los cruces realizados utilizando las plantas las fértiles obtenidas por cultivo de anteras. Los frutos obtenidos se le hicieron una caracterización por tamaño y número de semillas formadas.




Tabla 4. Cruzamientos realizados utilizando las plantas fértiles obtenidas por cultivo de anteras.

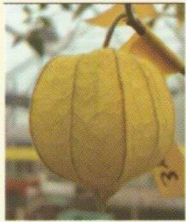
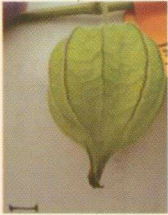
Cruce	Registro fotográfico	Numero de frutos colectados	Diámetro (cm)		° Brix	Numero de semillas/ fruto	Total semillas	Peso promedio/ fruto (gr)
			Longitudinal	Transversal				
1 X 1		6	1.8	1.8	15.8	70	797	2.06
			1.5	1.6	14.4	70		2.06
			1.6	1.6	17.3	150		2.03
						150		2.03
						123		2.60
						113		2.35
						121		2.36
1 X 2		2	0.9	0.8		3 Solo en uno de los frutos	3	0.23

1 X 3		2	1.6	1.7	13.4 15.3	231 248	479	3.91 2.98
1 X 4		4	1.4	1.4	11.6 13.8	78 70 70	218	1.67 1.04 1.02
2 X 1		---				---		-----

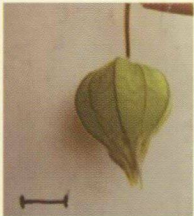
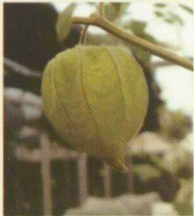





2 X 2		1				30	30	1.63
3 X 1		1				16.2	50 44	94
3 X 2								1.40 1.40

3 X 3		2			11.2 13.5	105 105 178		2.29 2.3 2.06
3 X 4			1.55	1.45	12.4 17.1	121 126		2.03
4 X 1					14.3 10.0	136 137		2.52 2.08



4 X 2			1.05	1.1		20		1.0
4 X 3		1	2	2	11.7	200 200 150	550	3.31 3.72 3.74
4 X 4		2	1.5	1.5	14.5 14.6 12.2 14.4	139 140 168 230	677	2.35 2.30 3.95 2.91



Conclusiones

- Es posible producir plantas completas y fértiles mediante cultivo *in Vitro* de anteras utilizando plantas de uchuva de cultivos comerciales.
- Con los cruzamientos entre plantas obtenidas *in vitro* se obtuvo semilla F1 como base para la evaluación híbridos en uchuva utilizando líneas genéticamente puras.
- A diferencia de otras especies ampliamente estudiadas, la uchuva responde fácilmente y en corto tiempo a la producción de embriones y plantas completas utilizando el cultivo de anteras.

Recomendaciones

La tecnología, que ofrece un proceso de obtención de líneas genéticamente puras, puede acorta el ciclo de generación de variedades e híbridos. Se recomienda que los protocolos descritos en esta publicación sean aplicados a materiales cultivados en otras regiones del país diferentes a los de Boyacá y Cundinamarca. Además, se recomienda que en el país se conforme un programa estructurado de mejoramiento genético como parte de un plan nacional integral de investigación.

Glosario

Antera. La antera y el filamento juntos forman el estambre, la parte masculina de la flor.

Haploide. Una célula u organismo que tienen un solo juego de cromosomas.

Doble haploide. Planta haploide que se le ha doblado su número de cromosomas.

Línea pura. Planta que su información genética es idéntica en cada par de cromosoma que posee.

Microspóras. Granos de polen en estado de desarrollo inmaduro.

In vitro. Literalmente significa dentro del vidrio. Es el cultivo de células, de tejidos u órganos en contenedores en condiciones asépticas.

Referencias

- Almanza, P y Fischer, G, 1993. "Nuevas tecnologías de la uchuva *Physalis peruviana* L", en Agro-Desarrollo 4 (1-2), págs. 292-304.
- Arbeláez, C.A.; Mora, M.A. 1990. Caracterización fenotípica de uchuva (*Physalis* sp.). (Medellín). 1990. 69 f. Monografía (Trabajo de pregrado de Ingeniería Agronómica) - Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 1990.
- Bonilla, M.; Espinosa, K.; Muñoz, J.; Vásquez, H. y Posso, A. 2005. Colección, caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de uchuva *Physalis peruviana*. En: Memorias IX Congreso de la Asociación Colombiana de Fitomejoramiento y Producción de Cultivos. CORPOICA, Palmira, mayo 11 - 13 de 2005. p. 103.
- CRFG. 1997. "Cape gooseberry *Physalis peruviana* L.", en California Rare Fruit Growers, Inc. Pág. 3.
- Fisher, G. 1989. Aspectos fisiológicos del desarrollo de la Uchuva. En: producción, Poscosecha y exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Unibiblos, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Págs. 9-26.
- Fischer, G y Angulo, R. 1999. Los frutales de clima frío en Colombia. "La uchuva", en ventana al campo andino 2(1). Págs. 3-6.
- Fisher, G. 2000. Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Págs. 9-23.



- Fisher, G.; Miranda, D.; Piedrahíta, W.; Romero, J. 2005. Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva *Physalis peruviana* L. en Colombia. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 221pp.
- Legiscomex. 2008. Inteligencia de mercados- Frutas exóticas en Colombia, Diciembre 3 del 2008.
- Lagos, T.; Criollo, H.; Ibarra, A. y Hejeile, H. 2003. Caracterización morfológica de la colección Nariño de uvilla o uchuva *Physalis peruviana* L. Fitotecnia Colombiana. 3(2):1-9.
- Lagos, Tulio; Vallejo, Franco; Escobar, Hernando y Muñoz, Jaime. 2008. Biología reproductiva de la uchuva. En: Acta agronómica (Palmira). 57 (2) 2008, p 81-87.
- Ligarreto, G; Lobo, M; Correa, A, 2005. Recursos genéticos del genero *Physalis* en Colombia. En: Avances en Cultivo, Poscosecha y Exportación de La Uchuva *Physalis peruviana* L.
- McCormick, Sheila. 2004. Control of male gametophyte development. The Plant Cell (2004) 16:S142-S153
- McCain, R. 1993. Goldenberry, passion fruit & white sapote: Potential fruits for cool subtropical areas. pp. 479-486. En: Janick, J. y J.E. Simon (Eds.). New crops. Wiley, New York.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – MADR. 2009. Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2004 – 2008 y sus calendarios de siembras y cosechas. Dirección de política Sectorial. Grupo de Sistemas de Información. Bogotá D.C. ISBN No. 978-958-8536-11-8.
- Pulgarín, O. Caracterización fenotípica preliminar de 13 colecciones de uchuva (*Physalis peruviana* L.). 1989. 136 f. Monografía (Trabajo de pregrado de Biología, Departamento de Biología) - Universidad de Antioquia, Medellín, 1989.
- Sharma, A; Sharma A. 1991. Chromosome Techniques. Theory and Practice. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. England.



Talledo, D; Escobar, C; Alleman V. 1993. Introducción al análisis cromosómico en vegetales.

Lima, Universidad Ricardo Palma. 141 p.

Verheij, E; Coronel, R.E. (Eds), 1991. Plant resources of South-East Asia. Editorial Pudoc Wageningen. Págs. 254-256.

Wolff, X.Y. 1991."Species, cultivar, and soil amendments influence fruit production of two *Physalis* species", en HortScience 26 (12). Págs. 1558-1559.



Cámara
de Comercio
de Bogotá

FICHA CONTROL DE PRESTAMOS

Versión	2
Código	GCS-PRE-PPS-F-003
Fecha	01/07/2010

SALITRE



34139

Cámara
de Comercio
de Bogotá

El género *Physalis* incluye alrededor de cien especies que se caracterizan porque sus frutos están cubiertos por el cáliz. *Physalis peruviana* L., nombre científico de la uchuva, es la especie más conocida del género, originaria de los Andes, especialmente de Perú, Bolivia y Colombia donde crece como planta silvestre y semisilvestre en zonas entre 1.500 a 3.000 m.s.n.m. Se encuentra desde Venezuela hasta Chile, a todo lo largo y ancho de la cordillera andina, pero sólo en Colombia se cultiva con fines comerciales, donde posiblemente se inició el cultivo en la década de los años 80 y ha llevado al país a ser el primer productor mundial.

Aunque Colombia posee las condiciones propicias para el cultivo de la uchuva, una gran limitante es la falta de material de siembra con características morfológicas, químicas y agronómicas, para la selección y mejoramiento genético, con atributos de rendimiento, calidad de fruto, resistencia a enfermedades, y composición química conocidas deseable.

Para lograrlo, es necesaria la creación de programas de producción de variedades en un corto y mediano plazo, utilizando material que se siembra actualmente para exportación y otros que se obtengan por investigación. El mejoramiento genético convencional ofrece posibilidades para la obtención de variedades e híbridos pero es un proceso largo y lento, que ante las grandes necesidades de sostenibilidad del cultivo resulta demorado y costoso. Como alternativa, la biotecnología ofrece la posibilidad de producir plantas completas in vitro a partir de granos de polen mediante el cultivo de anteras, las cuales darán origen a líneas mejoradas o líneas puras para la obtención de híbridos comerciales. En esta publicación se describe por primera vez la metodología desarrollada para la implementación de un proceso de producción masiva, rápida y rutinaria en la obtención de nuevas variedades e híbridos comerciales de uchuva.

ISBN 978-958-688-379-5



9 789586 883795